

**PRODUCCIÓN DE METANO A PARTIR DE BAGAZO DE FIQUE PRETRATADO
CON NaOH**

**SONIA LILIANA MERCHÁN CÁCERES
LUZ ANGÉLICA PARRA HERRERA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2010

**PRODUCCIÓN DE METANO A PARTIR DE BAGAZO DE FIQUE PRETRATADO
CON NaOH**

**SONIA LILIANA MERCHÁN CÁCERES
LUZ ANGÉLICA PARRA HERRERA**

**Proyecto de grado para optar al título de
Ingeniero Químico**

Director

**HUMBERTO ESCALANTE HERNANDEZ
Ingeniero Químico Ph.D.**

Co-director (a)

**CAROLINA GUZMÁN LUNA
Bacterióloga Ph.D.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2010

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por su eterna compañía, por permitirnos realizar este trabajo con paciencia, dedicación y esfuerzo e iluminarnos cada día por el camino del aprendizaje.

A la Universidad Industrial de Santander.

Al director del proyecto, PhD. Humberto Escalante Hernández, por la oportunidad de realizar este trabajo y ampliar nuestros conocimientos.

A la Codirectora, Carolina Guzmán por su aporte y colaboración.

A la Ingeniera Química, Liliana del Pilar Castro, por su colaboración y paciencia en el desarrollo del proyecto.

A la Bacterióloga, Mabel Juliana Quintero, por compartir sus conocimientos y por hacernos más ameno el trabajo.

A los compañeros que hicieron parte del grupo de trabajo por su apoyo, y compañía.

A los Técnicos del Laboratorio de Procesos Escuela de Ingeniería Química, “Eduardo y Wilson” por su apoyo y colaboración desinteresados.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Dios, quien guía cada paso en mi vida, a mis padres Rafael y Elvira por su amor, sacrificio y apoyo incondicional, a mis hermanos por su apoyo, a mi tío David, esposa e hijas por abrirme las puertas de su casa, brindarme cariño, apoyo y valiosos consejos por hacerme parte de su familia, a mi compañera Angélica por su comprensión y enseñanza, y a todos mis amigos por darme ánimo a cada instante especialmente a Nohora y Julián.

Sonia Lílíana Merchán Cáceres

A mi mamá Teresa, por darme todo lo que necesito en esta mi vida, por enseñarme e inculcarme valores y sentimientos que me hacen ser persona, por su paciencia, sacrificio y en especial por su amor eterno, te adoro.

Al amor de mi vida Geoffrey, por su eterno apoyo, amistad y amor incondicional, por acompañarme en mis aventuras, por confiar y creer en mí como persona y como profesional y sobre todo por ser el pilar de mi vida, te amo.

A Julián, Silvia, Luna, Nata y Nina por ser la familia que siempre me espera con los abrazos abiertos y me hace sentir feliz.

A sonita, por todo el esfuerzo, las rabias, las risas y los momentos geniales que pasamos juntas, no te voy a olvidar.

Luz Angélica Parra Herrera

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	16
2. DESARROLLO EXPERIMENTAL	22
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS	25
4. CONCLUSIONES	38
BIBLIOGRAFIA	39
ANEXOS	43

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Variables de entrada del pretratamiento alcalino.	22
Tabla 2. Variables fijas del pretratamiento alcalino	23
Tabla 3. Caracterización de los sustrato BF sin tratar, BF tratado A, BF tratado B y el inóculo EC+LR.	25
Tabla 4. Matriz de Experimentos	26
Tabla 5. Análisis de Varianza del diseño de experimentos 1.	32
Tabla 6. Valores óptimos para la producción de metano.	34
Tabla 7. Análisis de Varianza del diseño de experimentos 2.	34
Tabla 8. Valores óptimos para la producción de metano del diseño 2.	36

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Esquema del objetivo del pretratamiento en los materiales lignocelulósicos	19
Figura 2. Concentración de azúcares reductores durante la producción de biogás.	27
Figura 3. Variación del pH durante la producción de biogás.	28
Figura 4. Concentración de AGV durante la producción de biogás.	29
Figura 5. Producción de metano	31
Figura 6. Diagrama de Pareto para concentraciones altas.	32
Figura 7. Efectos Principales de las variables, primer diseño de experimentos.	33
Figura 8. Diagrama de Pareto para concentraciones de NaOH bajas.	35
Figura 9. Efectos principales de las variables, segundo diseño de experimentos.	35
Figura 10. Medias de las producciones de metano de las concentraciones de soda estudiadas.	36

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. Diseño de experimentos	43
ANEXO B. Protocolo toma de muestra de bagazo	44
ANEXO C. Determinación del contenido de humedad del bagazo de fique	45
ANEXO D. Determinación de la concentración de azúcares reductores	46
ANEXO E. Determinación de ácidos grasos volátiles y alcalinidad en pulpa	48
ANEXO F. Principales etapas de la digestión anaerobia y grupos microbianos involucrados	49

RESUMEN

TITULO: PRODUCCIÓN DE METANO A PARTIR DE BAGAZO DE FIQUE PRETRATADO CON NaOH*

AUTORES: MERCHÁN CÁCERES SONIA LILIANA**
PARRA HERRERA LUZ ANGÉLICA**

PALABRAS CLAVES: Bagazo de Fique, Residuo lignocelulósico, Lignina, Pretratamiento, Digestión anaerobia, Biogás.

CONTENIDO:

Del proceso del beneficio del fique se genera un 96% de residuo compuesto por jugo y bagazo. Este bagazo de fique, ha sido empleado como sustrato en la producción de biogás y se clasifica como un residuo lignocelulósico, debido a su contenido en celulosa, hemicelulosa y lignina; este último representa una barrera al fácil acceso de los microorganismos hacia la celulosa, principal fuente de carbono. De acuerdo a lo anterior el objetivo del presente trabajo fue aplicar un tratamiento alcalino previo al proceso de digestión anaerobia del bagazo de fique con el fin de mejorar el contenido de metano en el biogás.

El desarrollo experimental se realizó en dos etapas, la primera correspondió al pretratamiento alcalino para la cual se tomaron como variables la concentración de NaOH al 0,5, 2, 4 y 6 %p/p y el tiempo de pretratamiento de 8 y 24 horas, con estos valores se realizaron dos diseños factorial 2^2 . La segunda etapa que correspondió al proceso de digestión anaerobia se llevo a cabo empleando como sustrato el bagazo resultante de la etapa anterior y como inóculo la mezcla compuesta por líquido ruminal- estiércol de cerdo en bioreactores de 500 mL. Fueron evaluados los parámetros fisicoquímicos del bagazo de fique sin tratar y de los experimentos y tres de las etapas del proceso de digestión.

Por último se determinó la influencia de cada una de las variables del diseño en la producción de metano utilizando el software *Statgraphics Plus 5.1*. Los resultados mostraron que los valores más bajos del diseño 0,5% NaOH y un tiempo de pretratamiento de 8 horas son los más propicios para aumentar el contenido de metano en un posible escalado.

* *Proyecto de Grado. Modalidad investigación*

** *Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Ph.D. Humberto Escalante Hernández. Codirector: Ph.D. Carolina Guzmán Luna.*

ABSTRACT

TITLE: PRODUCTION OF METHANE FROM FIQUE BAGASSE PRETREATED WITH NaOH *

AUTHORS: MERCHÁN CÁCERES SONIA LILIANA**
PARRA HERRERA LUZ ANGÉLICA**

KEYWORDS: Fique bagasse, lignocellulosic residue, lignin, pretreatment, anaerobic digestion, Biogas.

CONTENTS:

The benefit of fique process generates 96% of waste consisting of juice and bagasse. This fique bagasse has been used as substrate in biogas production and is classified as a lignocellulosic residue, due to its content in cellulose, hemicellulose and lignin, the latter represents a barrier to easy access of microorganisms to cellulose, the main carbon source. According to the above, the objective of this study was to apply an alkaline treatment prior to anaerobic digestion of fique bagasse in order to improve the content of methane in the biogas.

The development was carried out in two stages, the first corresponded to the alkaline pretreatment for which variables taken were the concentration of NaOH to 0.5, 2, 4 and 6% w / w and pretreatment time of 8 to 24 hours, these values were two factorial designs 2^2 . The second stage corresponded to the anaerobic digestion process was carried out using as substrate bagasse resulting from the previous stage as the inoculums, the mixture of rumen fluid –pig manure in 500 mL bioreactors. Physicochemical parameters were measured from pretreated and untreated fique bagasse, and three stages of the anaerobic digestion process.

Finally we determined the influence of each design variables in the production of methane using the Statgraphics Plus 5.1 software. The results showed that the lowest values of design ,0.5% w/w NaOH and a pretreatment time of 8 hours are the most likely to increase the methane content of a possible escalation.

* *Working Grade. Research mode.*

** *Physicochemical Engineering Faculty. School of Chemical Engineering.
Director: Ph.D. Humberto Escalante Hernández. Co-director: Ph.D. Carolina Guzmán Luna.*

INTRODUCCIÓN

El fique pertenece al género *Furcraea*, nombre científico *Agave spp* (de la familia *Agavaceae*). En Colombia esta planta crece casi en todos los climas por su adaptabilidad y resistencia [1]. El proceso de beneficio del fique genera por cada 1000 kg de hoja 40 kg de fibra y 960 kg de residuos compuestos de bagazo y jugo. Una pequeña fracción del bagazo se emplea en la producción abonos orgánicos, concentrado para animales, sustrato para el cultivo de hongos comestibles, principios activos farmacéuticos, agentes tensoactivos, bioinsecticidas, papel y biogás [2-6]. Sin embargo, los grandes volúmenes de estos residuos son desechados directamente al medio generando problemas ambientales [1]. De acuerdo a su composición fisicoquímica el bagazo de fique se clasifica como una biomasa, y con opción de producción de biogás [4,6].

La biomasa lignocelulósica está compuesta por celulosa, hemicelulosa (que en conjunto se les llama holocelulosa) y lignina; asociadas entre sí, cuyo fin es el de proveerle soporte estructural a la pared celular [7]. Estas fracciones varían cualitativa y cuantitativamente de acuerdo al tipo de biomasa [8].

La principal fracción polimérica del bagazo de fique y que se encuentra en mayor proporción es la celulosa; éste compuesto es insoluble en agua, insípido, es un polisacárido (carbohidrato no reductor) y posee un peso molecular altamente elevado. La celulosa está compuesta por unidades de D-glucosa unidas entre sí por enlaces β -1,4 glucosídicos, estructuralmente consta de una parte cristalina (organizada), y otra amorfa [7]. La parte cristalina de la celulosa confiere protección a la célula y constituye un impedimento estérico al ataque de reactivos; no ocurre lo mismo con la celulosa amorfa que es más susceptible de ser atacada.

Las hemicelulosas son carbohidratos que forman una estructura polimérica compleja, ramificada que consiste en la unión de diferentes unidades de azúcares: pentosas, hexosas y ácidos de estos azúcares [7]. La hemicelulosa suele ser un

polímero de menor masa molar que la celulosa y más fácilmente hidrolizable debido a su estructura predominantemente amorfa. La principal función de la hemicelulosa es la de servir como conexión entre las fibras de lignina y celulosa con el fin de brindar mayor rigidez a la estructura celulosa-hemicelulosa-lignina [9].

La lignina, es el segundo componente en abundancia en el bagazo de fique, es un polímero ramificado, amorfo y heterogéneo constituido por unidades de fenilpropano (p-cumarílico, coniferílico y alcohol sinapílico) unidos por diferentes clases de enlaces. La lignina tiene función en el ámbito estructural, para mantener unidos la celulosa y las hemicelulosas entre sí [7]. La lignina es un heteropolímero insoluble en agua y soluble en álcalis fuertes, ópticamente inactiva, extremadamente resistente a la acción de microorganismos y a la penetración de las enzimas destructivas en la pared celular; lo anterior la hace difícil a la degradación [7,10 ,11]. Su función principal es proporcionar rigidez a la pared celular del material y evitar la acción de microorganismos [12].

Digestión anaerobia de residuos lignocelulósicos

La digestión anaerobia es un proceso donde la materia orgánica es transformada en metano y dióxido de carbono, a través de un proceso microbiológico en ausencia de oxígeno. En este proceso se llevan a cabo una serie de reacciones bioquímicas en las que intervienen diferentes grupos de consorcios bacterianos en simbiosis [14]. Cuando un residuo lignocelulósico se somete a digestión anaerobia, se produce un biogás, con un alto contenido de metano. Sin embargo el principal obstáculo de la digestión anaerobia de los materiales lignocelulósicos, es su baja tasa de degradación, debido a su estructura [13,15]. Por otra parte la degradación eficiente de la materia orgánica mediante digestión anaerobia depende de la acción combinada de una población microbiana heterogénea, consistente en diversos géneros de bacterias anaerobias estrictas y facultativas [16]. La digestión anaerobia se lleva a cabo en cuatro etapas: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis [13,17].

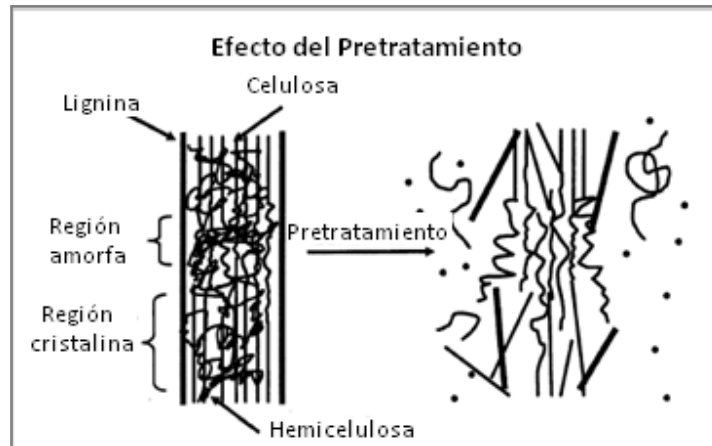
En la hidrólisis ocurre el rompimiento de las macromoléculas para facilitar la disponibilidad de sustratos menos complejos a otros microorganismos; dando como productos celobiosa, glucosa, pentosas y hexosas [18]. La lignina es un material altamente refractario a la degradación anaerobia, afectando también a la biodegradabilidad de la celulosa, hemicelulosa y de otros polímeros; llegando a convertir su degradación en el proceso limitante de la velocidad de hidrólisis y por tanto de la degradación anaerobia de determinados sustratos. En la acidogénesis la población bacteriana heterogénea asimila el producto de la hidrólisis, transformándolo en Ácidos Grasos Volátiles (AGV), hidrógeno y dióxido de carbono [18,19]. En la acetogénesis las bacterias acetogénicas transforman la glucosa en ácido acético y alcoholes [18,19]. La metanogénesis se lleva a cabo, a partir de los productos de la etapa anterior, dando como resultado la formación principalmente de metano y dióxido de carbono [18].

La digestión anaerobia tiene como productos finales el biogás, el cuál presenta propiedades como combustible ya que está compuesto fundamentalmente por metano, dióxido de carbono, sulfuro de hidrógeno y pequeñas cantidades de hidrógeno y oxígeno y los efluentes y lodos que sirven como biofertilizante por su contenido en nitrógeno, fósforo y potasio [19].

Tratamientos para modificar la estructura de los materiales lignocelulósicos

La digestibilidad de la biomasa lignocelulósica es limitada por la cristalinidad de la celulosa, por el grado de polimerización, el contenido de humedad, el área superficial disponible y el contenido de lignina [13,20]. Para romper la estructura de la biomasa lignocelulósica, descomponiendo la celulosa y la hemicelulosa en sus componentes fácilmente biodegradables [21] y favorecer su biodigestibilidad se han recomendado pretratamientos mecánicos [22], de hidrólisis ácida [7,23], alcalinos [24,15] y termoquímicos [17, 25, 26] (Ver figura 1). Los pretratamientos

pueden limitarse simplemente a generar un aumento de las regiones amorfas de la celulosa lo que conlleva a la mejora de la hidrólisis [27].



Fuente: Mosier et al [11]

Figura 1. Esquema del objetivo del pretratamiento en los materiales lignocelulósicos

El pretratamiento viable debe: a) mejorar la formación de azúcares, o la capacidad para formarlos posteriormente a través de hidrólisis enzimática, b) evitar la degradación o pérdida de carbohidratos, c) evitar la formación de subproductos inhibidores al posterior proceso de digestión, d) ser rentable y e) ser amigable con el medio ambiente [27].

Los pretratamientos se clasifican en tres categorías: i) físicos que consisten en someter la biomasa a la reducción del tamaño de partícula mediante molienda, temperatura, radiación, vapor, secado y/o humectación, ii) químicos, es decir someter la biomasa a la acción de H_2SO_4 y $NaOH$, H_2O_2 , con el fin de alterar la estructura del material y iii) biológicos, mediante los cuales un cultivo de microorganismos actúa sobre la biomasa y produce enzimas requeridas para degradar la lignina.

En el pretratamiento alcalino de la biomasa lignocelulósica con álcali ($NaOH$, $Ca(OH)_2$, KOH , NH_4OH) se lleva a cabo una reacción de solvatación y de saponificación; esto provoca un estado de hinchamiento (modificación a favor de la estructura cristalina de la celulosa) de la biomasa que aumenta el área

superficial disponible para el acceso de enzimas y bacterias [7]. El mecanismo de la hidrólisis alcalina de la biomasa parece estar basada en la saponificación de los enlaces ésteres intramoleculares que unen los xilanos de la hemicelulosa y otros componentes, como por ejemplo la lignina, u otros componentes de la hemicelulosa [27]. El principal efecto del pretratamiento es remover la fracción de lignina presente en la biomasa, mejorando la reactividad de los polisacáridos restantes [11]. El pretratamiento alcalino puede ser llevado a cabo a bajas temperaturas con tiempos de contacto hasta de días [4], o a altas temperaturas con tiempos de contactos que van de minutos a horas [15, 28,29]. Sin embargo, el tratamiento alcalino puede causar la solubilización, redistribución y condensación de la lignina, además de modificaciones en el estado cristalino de la celulosa. Así mismo cierta cantidad del álcali es convertido a sales irrecuperables que pueden llegar a inhibir la producción de metano [7].

Para materiales lignocelulósicos como paja, desechos de maíz, bagazo de caña y álamo, que poseen contenidos de lignina del 20%, se recomienda pretratarlos con álcali; ya que se obtienen una remoción de la lignina del 24-55% [21,28]. Para el caso de maderas blandas, cuyo contenido de lignina supera un 26 %, se presenta una difícil remoción [27]. Al aplicar el pretratamiento alcalino a la caña de azúcar (121°C-1 h, 20% p/v NaOH) se consigue remover un 88.28% de lignina [29]. Por otra parte someter bagazo de malta a un pretratamiento con NaOH al 2% p/v (relación sólido: líquido 1:20 g:g, 120°C ,90 minutos) permite obtener una remoción de la lignina del 84,5% [29]. En resumen, el pretratamiento alcalino es el mejor método para mejorar la biodegradación de materiales complejos [24]. El objetivo es romper el sello de la lignina y alterar la estructura cristalina de la celulosa, mejorando de esta forma el rendimiento en la etapa de hidrólisis y los rendimientos de metano [11].

Varios autores han empleado el pretratamiento alcalino antes del proceso de digestión anaerobia con el fin de mejorar la producción de metano; Yunquin *et al*

[15], pretrataron residuos de pulpa y papel con NaOH al 0,6% p/v en una relación solido-liquido de 1/2 (p/p), durante 6 h , obteniendo aumento de la producción en un 83% por encima del sustrato sin pretratar; Neves *et al* [30], emplearon residuos de cebada como sustrato y lo pretrataron con NaOH en la proporción 0,3 g NaOH/g ST , durante 12 h, logrando aumentar su producción en un 100% por encima de los residuos de cebada sin pretratar; De igual forma Zheng *et al* [21], pretrataron desechos de maíz con NaOH al 2% p/p, durante 3 días , aumentando la producción de metano en un 73,4% con respecto al control, sustrato como la paja de arroz también ha sido pretratada alcalinamente con NaOH al 8% p/p, mejorando los porcentajes obtenidos de metano hasta en un 20% [31].

De acuerdo a lo anterior el objetivo principal de este trabajo de investigación fue modificar la estructura del bagazo de fique, mediante un pretratamiento alcalino con NaOH para liberar la celulosa e incrementar los rendimientos en la bioproducción de metano mediante una digestión anaerobia. Las variables objeto de estudio fueron la concentración de NaOH y el tiempo de contacto; como variables de respuesta se tomaron el porcentaje de metano producido y los porcentajes de celulosa, hemicelulosa y lignina removidos.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

La incidencia del pretratamiento alcalino del bagazo de fique sobre su producción de biogás se evaluó a partir de biodigestiones anaeróbicas del residuo tratado con NaOH; utilizando como inóculo un consorcio microbiano y como variable respuesta el porcentaje de metano producido.

Pretratamiento del sustrato

Para el pretratamiento fueron preparadas con anterioridad cuatro soluciones de NaOH, de diferente concentración. Para cada experimento se procedió de la siguiente forma: a un vaso de precipitados de 600 mL se adicionaron 100 g de bagazo de fique. Seguidamente se adicionó la solución de soda y se agitó para homogenizar la mezcla. Luego de terminado el tiempo de contacto que el experimento requería se lavó con agua y se filtro hasta obtener un pH neutro. Cada experimento se realizó por duplicado. Luego de finalizado el pretratamiento se llevó el bagazo de fique a refrigeración para su utilización en la siguiente etapa.

El álcali escogido fue el hidróxido de sodio, y de acuerdo a experimentos realizados con anterioridad se tomaron las variables con mayor influencia en el pretratamiento, los valores de las variables de entrada del pretratamiento se muestran en la tabla 1.

Variable	Valor
Concentración de álcali(NaOH)	0,5%, 2%, 4%, 6%
Tiempo de contacto (horas)	8 , 24

Tabla 1. Variables de entrada del pretratamiento alcalino.

Se tomaron variables fijas como la relación sólido-líquido, el porcentaje de humedad del bagazo de fique, la cantidad de bagazo de fique a pretratar y la temperatura, estos valores se muestran en la tabla 2. Con las anteriores variables

fijas se calcularon los gramos de NaOH necesarios y el volumen de solución de NaOH a emplear.

Variables Fijas	Valor
Relación sólido-líquido	1:6 g/g
Temperatura del pretratamiento	25°C
Humedad	81,2%

Tabla 2. Variables fijas del pretratamiento alcalino

Se realizaron dos diseños de experimentos factoriales 2^2 (Anexo A).

Sustrato

Se recolectaron muestras de bagazo de fique en la planta de beneficio de la finca Guayabetal (Mogotes - Santander), de acuerdo al protocolo de toma de muestra (Anexo B). Las muestras se almacenaron en recipientes herméticos refrigerados, y se trasladaron al laboratorio para su análisis. Al bagazo de fique se le determinó: la humedad, de acuerdo a la norma TAPPI Standard T3 m (Anexo C), pH, concentración de Sólidos Totales (ST), concentración de Sólidos Volátiles (SV) y relación Carbono/Nitrógeno C/N (método estándar para aguas residuales) y el contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina (análisis bromatológico de Van Soest), los resultados se muestran en la tabla 4.

Inóculo

Se utilizó un consorcio microbiano compuesto de la mezcla de Líquido Ruminal (LR) y Estiércol de Cerdo (EC) en proporción de 1:1 (v/v). El líquido ruminal se recolectó en el frigorífico el Vijagual (Rionegro - Santander). El estiércol de cerdo fue recolectado de la porcícola Portoferrayo (Mesa de los Santos - Santander). La caracterización del inóculo se muestra en la tabla 4.

Biodigestión anaeróbica

Para la producción de biogás se llevaron a cabo fermentaciones de bagazo de fique (previamente pretratado con NaOH) en bioreactores de 500 mL, con un volumen de operación de 350 mL. El inóculo empleado fue la mezcla (LR+EC). Se utilizó una relación sustrato – inóculo de 1 g SV/g SV. El periodo de operación fue de 10 días a una temperatura de 39 +/- 2°C. Se incluyó un experimento control, que contenía el bagazo de fique sin pretratar. Las fermentaciones se llevaron a cabo por duplicado.

Se tomó como variable de respuesta de la fase hidrolítica la concentración de azúcares reductores. Esta cuantificación se realizó con el método colorimétrico del ácido dinitrosalicílico – DNS (Anexo D), utilizando un espectrofotómetro marca GENESYS 20 *Thermo Spectronics*, a una longitud de onda de 540 nm. Las muestras se recolectaron diariamente.

Para la fase acidogénica se tomó como variable de respuesta la concentración de ácidos grasos volátiles, para lo cual se realizaron pruebas destructivas periódicamente durante 10 días. La cuantificación se realizó de acuerdo al protocolo empleado por el laboratorio (Anexo E).

La fase metanogénica tuvo como variable de respuesta el porcentaje de metano producido diariamente. Se cuantificó con un detector de gases infrarrojo modelo PGD3-IR marca *Status Scientific Controls*. El pH del proceso fue medido a lo largo del periodo de digestión con un pH-metro marca *SCHOTT* portátil.

Análisis Estadístico

El diseño de experimentos se analizó estadísticamente, aplicando el *software StatGraphics plus 5.1 (StatPoint Inc; Virginia, EE.UU)*.

RESULTADOS

- *Efecto del pretratamiento alcalino sobre la estructura lignocelulósica del BF , caracterización fisicoquímica del inóculo (LR+EC)*

Los resultados correspondientes a los parámetros fisicoquímicos del inóculo, bagazo de fique, y los experimentos se muestran en la tabla 3.

Variable	Unidades	BF sin tratar	BF tratado A	BF tratado B	LR+EC
pH		4	7	7	8
Humedad	%	81,548	80	80	ND
ST	%	19,07	19,07	19,07	19,07
SV	%	16,39	16,39	16,39	23,6
Alcalinidad	mg CaCO ₃ /L	3300	ND	ND	3100
AGV	mg/L	10800	ND	ND	7200
Celulosa	%	41,81	40,71	36,47	ND
Hemicelulosa	%	22,17	22,03	19,01	ND
Lignina	%	15,56	12,78	9,46	ND
FDA	%	64,66	57,05	56	ND

FDA: Fibra detergente ácida

ND: No determinado

BF tratado A: [NaOH 6%p/p], tiempo de contacto: 8 horas BF tratado B:[NaOH 6%p/p], tiempo de contacto:24 horas.

Tabla 3. Caracterización de los sustrato BF sin tratar, BF tratado A, BF tratado B y el inóculo EC+LR.

Los resultados muestran que el pH del BF tratado A y BF tratado B se ven afectados por el pretratamiento debido a la neutralización que implica el proceso. El BF sin tratar presenta pH ácido, lo cual es compensado con la adición del inóculo.

La concentración de sólidos volátiles, sólidos totales y ácidos grasos volátiles no se ven afectados al aplicar el pretratamiento, por tanto al igual que en el BF sin tratar, el inóculo logra establecer un equilibrio que lo convierte en el más adecuado para la degradación de este sustrato.

Con respecto al BF sin tratar se obtuvieron remociones de lignina, hemicelulosa y celulosa de 15,7%, 0,63%, 2,6% respectivamente para el BF tratado A, 37,59%, 14,25%, 12,77% respectivamente para el BF tratado B.

Los anteriores valores muestran que el contenido de lignina para una misma concentración disminuye significativamente con el tiempo de contacto, en cuanto al contenido de celulosa y hemicelulosa se puede afirmar que al emplear tiempos de contacto más largos, la solución de NaOH tiende a solubilizarlos. La Fibra Detergente Ácida (FDA) es un parámetro que indica la biodegradabilidad del material y varía inversamente con este, de acuerdo a lo anterior el pretratamiento disminuyó este porcentaje aumentando la biodegradabilidad del bagazo de fique.

- *Efecto del pretratamiento alcalino sobre la etapa hidrolítica*

La matriz de experimentos resultado de los diseños factoriales se muestran en la tabla 4.

Experimento (BF tratado con NaOH)	Tiempo (h)	[NaOH] (%p/p)
1	8	4
2	8	6
3	24	4
4	24	6
5	8	0,5
6	8	2
7	24	0,5
8	24	2

Tabla 4. Matriz de Experimentos

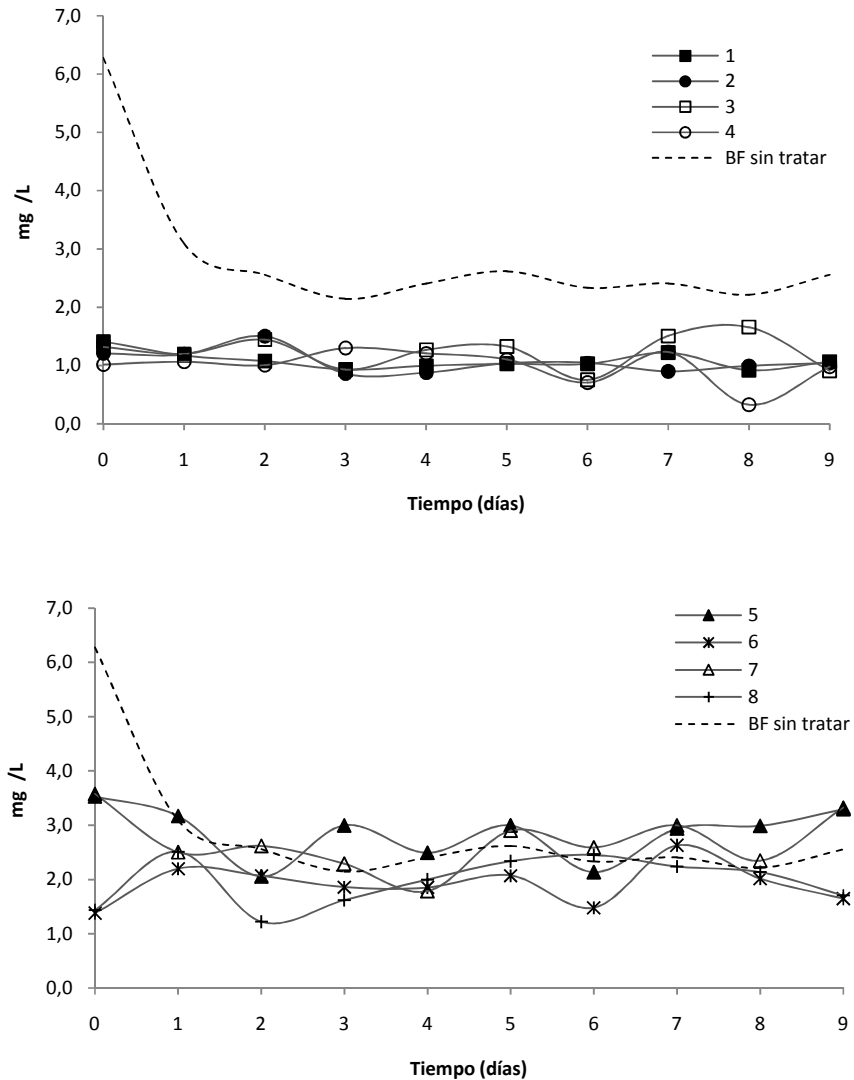


Figura 2. Concentración de azúcares reductores durante la producción de biogás.

El rendimiento de la etapa hidrolítica para el proceso de metanización se puede expresar en función de la concentración de Azúcares Reductores Totales (ART). El efecto del álcali sobre la concentración de ART se evidencia el día de arranque del proceso, de esta forma, una mayor concentración de soda, disminuye la concentración de azúcares disponibles debido a que los azúcares disueltos quedan incorporados en el licor resultante, el cual presenta una concentración de

20 mg/L de ART. Sin embargo, la cantidad de azúcares presentes en el bagazo tratado, es suficiente para el arranque y estabilización de la etapa hidrolítica del proceso, contrario a la tendencia que presenta el control, el cual se estabiliza el segundo día de digestión (Figura 1).

▪ *Efecto del pretratamiento sobre la etapa acidogénica*

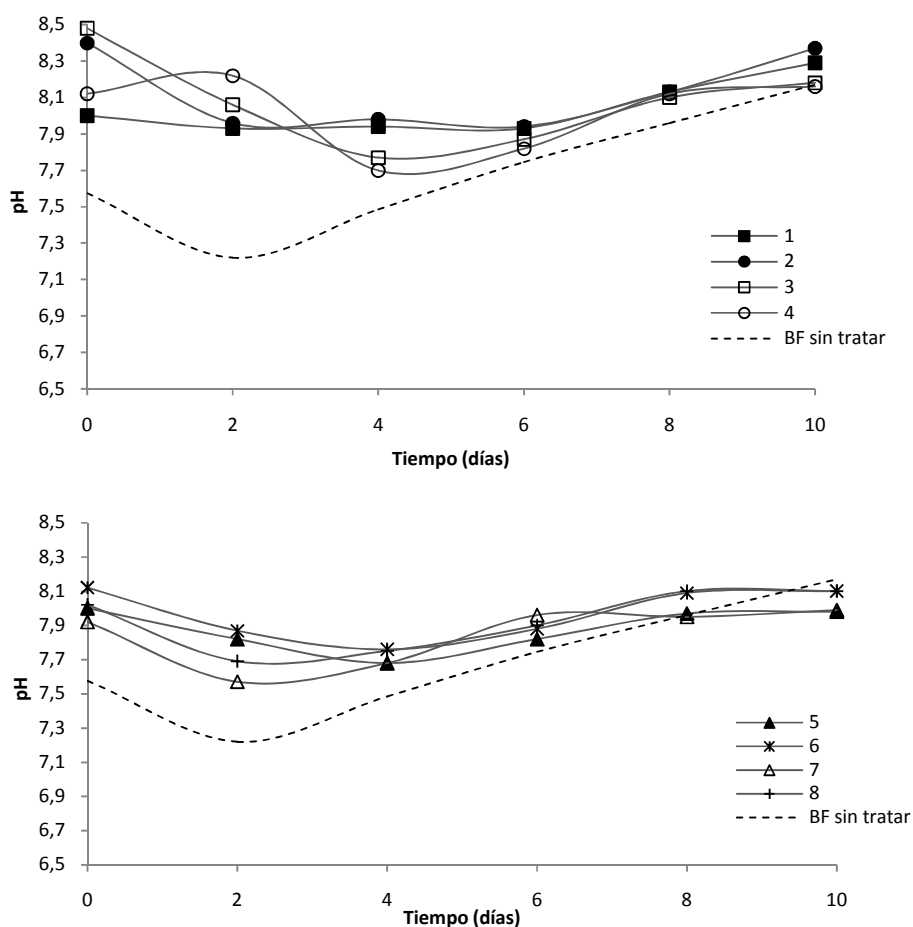


Figura 3. Variación del pH durante la producción de biogás.

Con el objeto de alcanzar una eficiente metanogénesis, los consorcios microbianos deben tener condiciones aptas para su crecimiento y metabolismo. De esta manera las bacterias hidrolíticas desarrollan eficientemente su metabolismo a pH neutros y/o ligeramente alcalinos, las bacterias acidogénicas

crecen en ambientes ligeramente ácidos y los microorganismos metanogénicos en pH cercanos a la neutralidad [15,17, 32,33]. Lo anterior se puede apreciar en la figura 3, donde el pH se encuentra en un intervalo entre 7,5 -8,5, favoreciendo la producción de AGV tanto para el bagazo tratado con álcali como para el bagazo sin tratar.

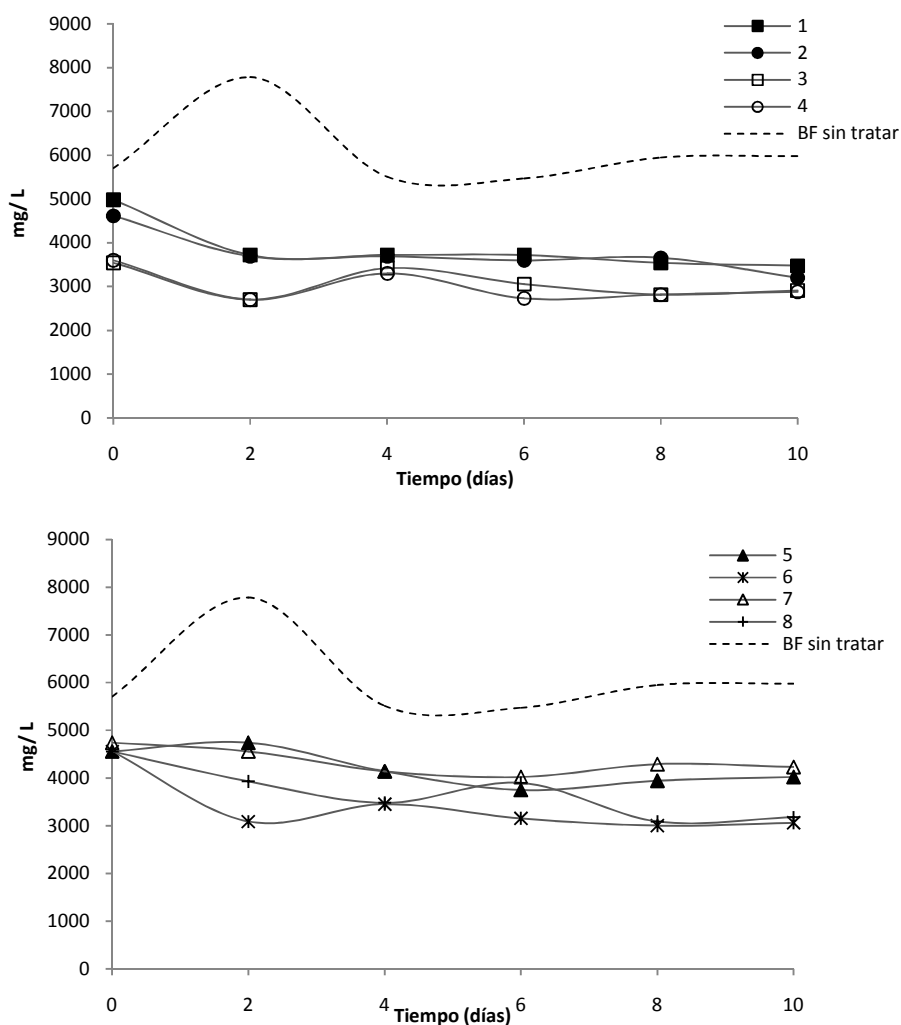
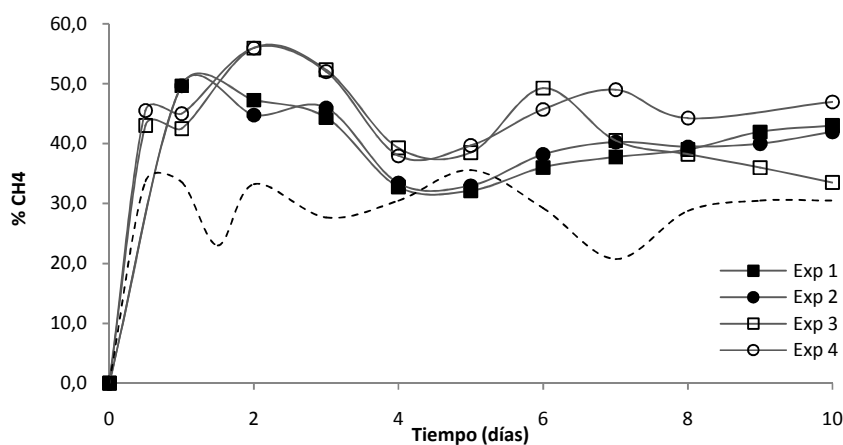


Figura 4. Concentración de AGV durante la producción de biogás.

La acidogénesis es la etapa intermedia del proceso de digestión anaerobia, en la cual los compuestos orgánicos se convierten principalmente en Ácidos Grasos Volátiles Totales (AGVT). Estos ácidos pueden ser: ácido acético, ácido

propiónico, ácido butírico, ácido valérico, dependiendo del tipo de sustrato y de las condiciones de operación. Por lo anterior se infiere que al aplicar el tratamiento alcalino sobre el bagazo de fique se modifica selectivamente la ruta metabólica de los consorcios microbianos, así una menor concentración de soda proporciona mayor concentración de AGV totales como se muestra en las curvas de la figura 4, dando lugar al paso de los ART a acetato, el cual posteriormente se convierte al producto principal metano. Por esta razón, a pesar de que el bagazo sin tratar presenta una alta concentración de azúcares reductores y de ácidos grasos volátiles no es eficiente en la bio-conversión a metano. Se puede afirmar que la acumulación de Ácidos Grasos Volátiles Totales (AGVT) en el bagazo sin tratar corresponde a AGV diferentes al acetato, ocasionando disminución en el rendimiento de la etapa acetogénica, incrementando el tiempo de adaptación y estabilización en la digestión anaerobia. En el anexo F se muestran las ecuaciones de la ruta metabólica de los consorcios microbianos.

- *Efecto del pretratamiento sobre la producción de metano a partir del bagazo de fique*



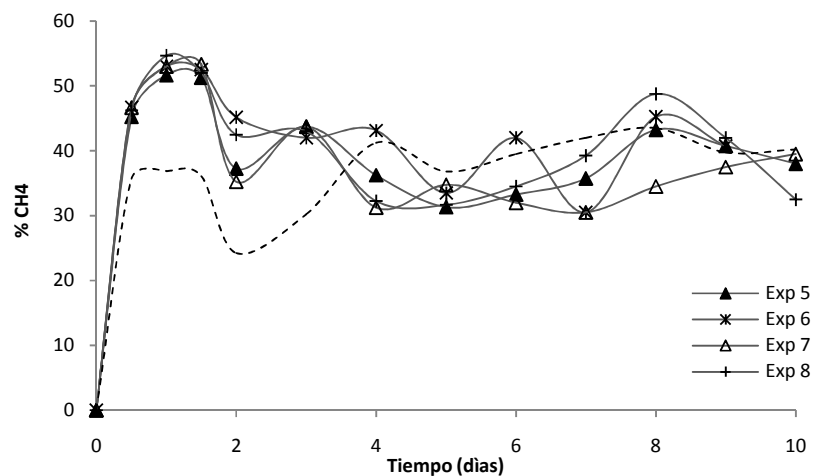


Figura 5. Producción de metano

En la figura 5 se observa que todos los reactores tienen un arranque favorable para la producción de metano, sin embargo durante los primeros tres días de digestión se aprecian diferencias significativas en cuanto al tiempo de reacción y producción de metano con respecto al bagazo sin tratar, alcanzando la máxima producción de metano (56%) el primer día. Asimismo se aprecia que no hay diferencias significativas entre la producción de metano y la concentración de soda. En la figura se muestra que el bagazo sin tratar presenta estabilidad al tercer día de digestión y que la concentración de soda es directamente proporcional a la estabilidad del proceso.

La fluctuación que se observa en las figuras se debe a que el proceso se lleva a cabo con microorganismos, los cuales como cualquier organismo vivo sufre alteraciones por la aclimatación de los microorganismos a las condiciones del medio. Los resultados de este trabajo se corroboran con los obtenidos por Neves *et al* [30] y Zheng *et al* [21].

- **Análisis estadístico del diseño de experimentos 1** (Ver anexo A)

Análisis de varianza

La estadística consiste en un análisis de varianza que mide la producción de metano en partes separadas respecto de cada efecto

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrados medios	Valor F	Valor P
A:[NaOH]	49,75	1	49,75	43,89	0,0070
B:Tiempo	1,16281	1	1,16281	1,03	0,3858
AB	22,9503	1	22,9503	20,24	0,0205
Error total	3,40094	31,13365			

R-cuadrado = 95,6% R-cuadrado (ajustado para Grados de Libertad (G.L.) = 92,3%.

Tabla 5. Análisis de Varianza del diseño de experimentos 1.

La tabla 5 prueba la significancia estadística de cada efecto por comparación de los cuadrados medios y la estimación del error experimental. En este caso dos de los efectos tienen los p-valores inferiores a 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero en un 95% de confianza.

El estadístico R-cuadrado indica que el modelo fijado tiene un 95,61% de la variabilidad en metano. El estadístico R-cuadrado ajustado, es conveniente para comparar modelos con diferentes números de variables independientes, con un valor de 92,3%.

Efecto de las variables

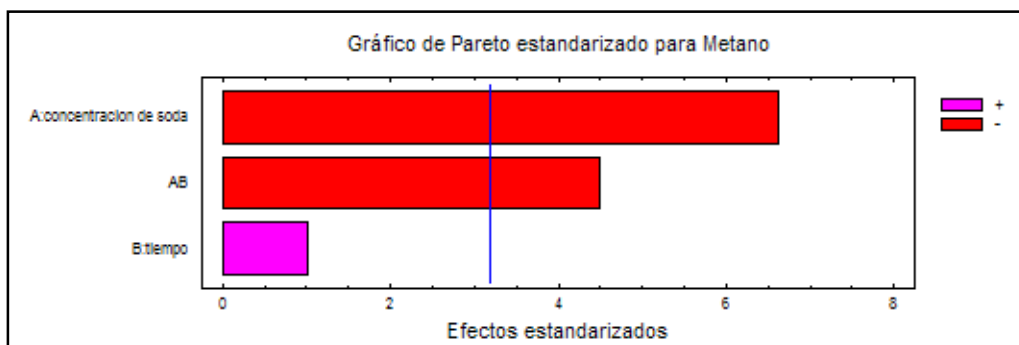


Figura 6. Diagrama de Pareto para concentraciones altas.

Teniendo en cuenta el análisis de los efectos de cada una de las variables del diseño de experimentos, se obtiene el diagrama de Pareto.

La línea vertical representa el límite de significancia de los efectos de los experimentos. A la derecha se encuentran aquellos que son relevantes en el modelo estadístico y a la izquierda los de importancia despreciable. Sin embargo, no puede despreciarse el efecto que tiene el tiempo de contacto entre el bagazo de fique y la soda, debido a que estadísticamente representa un efecto positivo, además físicamente no se puede despreciar porque el tiempo es inherente al proceso del pretratamiento alcalino.

De acuerdo con el gráfico de los efectos principales, la producción de metano es inversamente proporcional a la concentración de soda y directamente proporcional al tiempo de contacto entre el bagazo de fique durante el pretratamiento

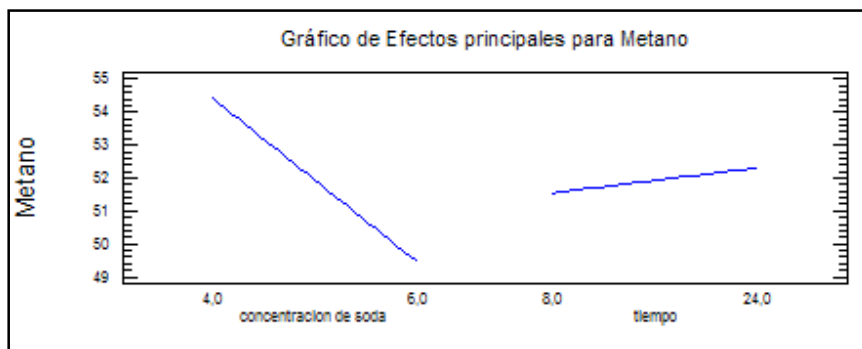


Figura 7. Efectos Principales de las variables, primer diseño de experimentos.

Valores óptimos para la producción de metano aplicando pretratamiento alcalino para el bagazo de fique

Al realizar un análisis estadístico preliminar de la optimización del proceso de producción de metano, se obtiene el siguiente resultado:

Valor Optimo = 56,5%

Factor	Inferior	Superior	óptimo
[NaOH] (%)	4,0	6,0	4,0
Tiempo(horas)	8	24	24

Tabla 6. Valores óptimos para la producción de metano.

Del análisis estadístico se puede concluir que una alta concentración de soda durante el pre tratamiento alcalino no presenta un efecto significativo sobre la variable de respuesta producción de metano, contrario al tiempo de contacto entre el bagazo de fique y la solución de soda, debido a que un mayor tiempo de contacto durante el pre tratamiento favorece los rendimientos de la producción de metano.

▪ **Análisis estadístico del diseño de experimentos 2**

Análisis de varianza

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrados medios	Valor F	Valor P
A:[NaOH]	4,06125	1	4,06125	145,48	0,0012
B:Tiempo	4,96125	1	4,96125	177,72	0,0009
AB	0,00125	1	0,00125	0,04	0,8460
Error total	0,08375	3	0,0279167		

R-cuadrado = 99,1329% R-cuadrado (ajustado para Grados de Libertad (G.L.) = 98,4826%.

Tabla 7. Análisis de Varianza del diseño de experimentos 2.

En este diseño dos de los efectos presentan P-valores inferiores a 0,05, indicando diferencias significativas en un 99 % de confianza.

Efecto de las variables

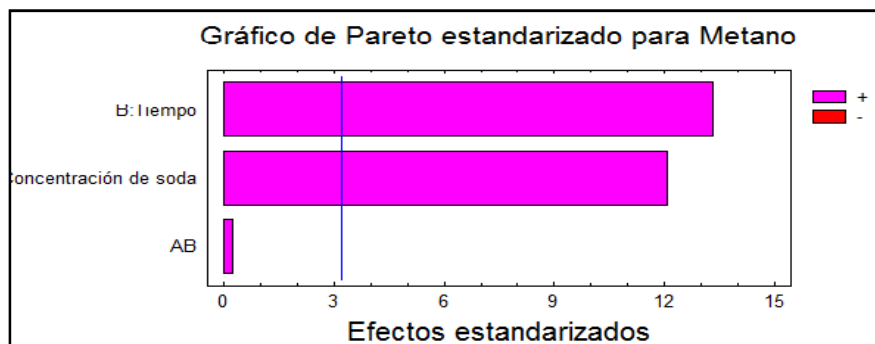


Figura 8. Diagrama de Pareto para concentraciones de NaOH bajas.

El diagrama de Pareto muestra que las variables tiempo y concentración presentan efectos positivos sobre la producción de metano.

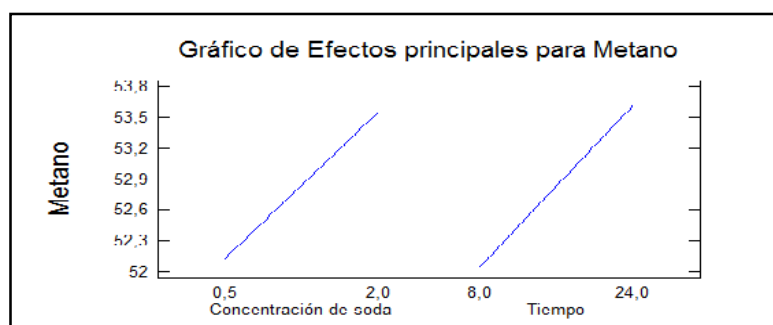


Figura 9. Efectos principales de las variables, segundo diseño de experimentos.

Los efectos principales muestran para este diseño sugieren que la concentración y el tiempo son directamente proporcionales a la producción de metano.

Valores óptimos para la producción de metano aplicando pretratamiento alcalino para el bagazo de fique

El análisis estadístico preliminar de la optimización del proceso de producción de metano para este diseño se muestra en la tabla 8.

Valor Optimo = 54,3 %

Factor	Inferior	Superior	óptimo
[NaOH] (%)	0,5	2	2
Tiempo (horas)	8	24	24

Tabla 8. Valores óptimos para la producción de metano del diseño 2.

Del análisis estadístico preliminar de la optimización se puede concluir que una alta concentración de soda durante el pretratamiento alcalino presenta un efecto positivo sobre la variable de respuesta producción de metano, al igual que el tiempo de contacto entre el bagazo de fique y la solución de soda, debido a que un mayor tiempo de contacto durante el pre tratamiento favorece los rendimientos de la producción de metano.

Medias de las producciones de metano para las diferentes concentraciones de soda

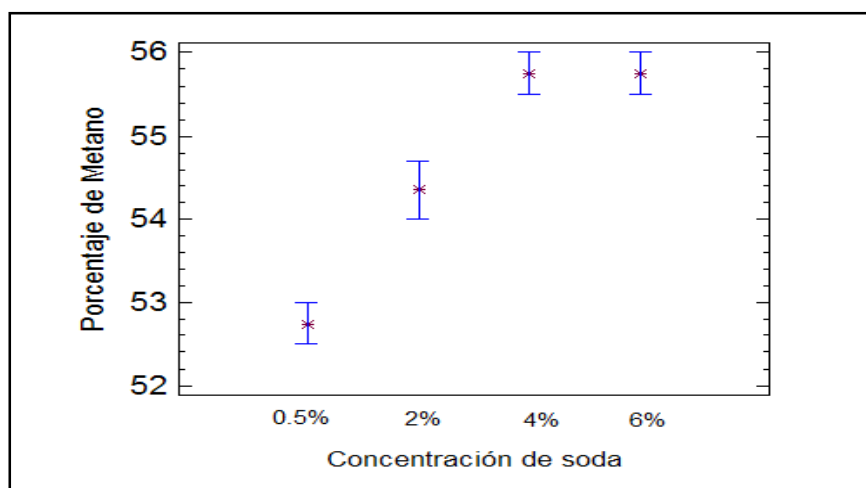


Figura 10. Medias de las producciones de metano de las concentraciones de soda estudiadas.

Como el valor de la función de probabilidad P del test de Fisher (f) es inferior a 0,05 muestra diferencias estadísticas significativas entre las medias de las cuatro variables a un nivel de confianza el 95% .La medias de las concentraciones 6% y 4% no presentan diferencias significativas entre ellas, pero en comparación con las concentraciones 0,5% y 2%, si se presentan diferencias significativas.

CONCLUSIONES

1. El pretratamiento alcalino modifica la estructura lignocelulósica del bagazo de fique, removiendo fracciones de lignina y manteniendo un rango de pH y AGV favorable para los consorcios microbianos logrando una producción de metano más eficiente.
2. Se comprobó que aplicar el pretratamiento alcalino con NaOH como álcali al bagazo de fique reduce los tiempos de digestión con respecto al bagazo de fique sin tratar.
3. No existe diferencia significativa entre los experimentos, luego para un posible escalado se recomiendan los niveles más bajos del diseño: 0,5% p/p de NaOH y tiempo de pretratamiento de 8 horas, para el cual se obtuvo una producción 20% mayor con respecto al BF sin tratar.
4. Debido a que se infiere que el pretratamiento alcalino es selectivo para la formación de ácidos grasos volátiles, es posible sugerir que al realizar el proceso de digestión anaerobia en dos etapas: Hidrolítica-Acidogénica y Acetogénica-Metanogénica se obtiene un mayor control sobre el bioproceso.

BIBLIOGRAFIA

- [1] COLOMBIA. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural: Guía Ambiental del Subsector Fiquero. Bogotá D. C. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, CORPOICA, CADEFIQUE. 2006. 121 p. 7
- [2] MOJICA, A., PAREDES, J., *El cultivo del fique en el departamento de Santander*. Centro regional de estudios económicos Bucaramanga, julio 2004 Bucaramanga, pág.9, 12,15.
- [3] RAVEN, R.P.J.M; GREGERSEN, K.H. (2007). *Plants in Denmark: Successes and Setbacks*. Renewable and Sustainable Energy Review. (11) p.116-132.
- [4] BARRERA, Y.P., SALAS, M.X., CASTRO L., ORTIZ, C., ESCALANTE, H. *Estudio preliminar de la bioproducción de metano a partir de los residuos del proceso del beneficio del fique*. Revista ION, Bucaramanga (Colombia), 22(1): 21-25, Junio – 2009.
- [5] ESTRADA. Análisis económico y ventajas comparativas en el procesamiento y aplicación del abono proveniente de los jugos y el bagazo de fique en fibras Naturales. 1997. Rionegro-Antioquia.
- [6] CASTRO, L., ESCALANTE, H. *Producción de biogás a partir del bagazo generado durante el beneficio de fique*. Universidad del Quindío - 9, 10 y 11 de septiembre de 2009– Armenia, Colombia
- [7] HENDRIKS, A., ZEEMAN, G. *Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass*. Bioresource Technology 100 (2009) 10–18.
- [8] FERNANDES, T., KLAASSE BOS, G., ZEEMAN, G., SANDERS, J., VAN LIER, J. *Effects of thermo-chemical pre-treatment on anaerobic biodegradability and hydrolysis of lignocellulosic biomass*. Bioresource Technology 100 (2009).
- [9] SAHA, B. *Hemicellulose bioconversion*. [Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology](#)., 30, 279-291. (2003).

- [10] PRASAD, K., SERRANO, M., THOMSEN, A., KONGJAN, P., ANGELIDAKI, I. *Bioethanol, biohydrogen and biogas production from wheat Straw in a biorefinery concept*. *Bioresource Technology*, 100 (2009) 2562–2568.
- [11] MOSIER, N., WYMAN, C., DALE, B., ELANDER, R., LEE, Y., HOLTZAPPLE, M., LADISCH, M. *Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass*. *Bioresource Technology*, 96 (2005) 673–686.
- [12] SUN, R., TOMKINSON, J., Sun, X., Wang, N. *Fractional isolation and physico-chemical characterization of alkali-soluble lignins from fast-growing poplar wood*. *Polymer*, 41, 8409–8417. (2000).
- [13] MATA-ÁLVAREZ J., MACÉ S., LLABRÉS P.. *Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives*. *Bioresource Technology*, 74 (2000).
- [14] CHEN, Y., CHENG, J. J. , CREAMER, K.S. *Inhibition of anaerobic digestion process: A review*. *Bioresource Technology*, 99 (2008) 4044–4064.
- [15] YUNQIN, L., DEHAN, W., SHAOQUAN, W., CHUNMIN, W. *Alkali pretreatment enhances biogas production in the anaerobic digestion of pulp and paper sludge*. *Journal of Hazardous Materials*, 170 (2009) 366–373.
- [16] GRIFFIN, M. E.; MACMAHON, K. D.; MACKIE, R. I.; RASKIN, L. *Methanogenic population dynamics during start-up of anaerobic digesters treating municipal solid waste and biosolids*. *Biotechnology and Bioengineering*. 1998, 57: 342 -354.
- [17] WARD, A., HOBBS, P., HOLLIMAN, P., JONES, D. *Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources*. *Bioresource Technology*, 99 (2008) 7928–7940.
- [18] MADIGAN, M, M.J., PARKER J, Brock. *Biología de los microorganismos*. Prentice Hall Iberia: Madrid, 8 ed., 1999, p. 562-564.
- [19] HILBERT, J. A. *Manual para la producción de biogás*. Instituto de Ingeniería Rural I.N.T.A. – Castelar

<http://www.inta.gov.ar/iir/info/documentos/energia/manubiogas.zip>

- [20] PRASAD S., SINGH, A., JOSHI, H. *Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues*. Resources, Conservation and Recycling, 50 (2007) 1–39.
- [21] ZHENG, M., LI, X., LI, L., YANG, X., HE, Y. *Enhancing anaerobic biogasification of corn stover through wet state NaOH pretreatment*. Bioresource Technology, 100 (2009) 5140–5145.
- [22] MSHANDETE, A., BJÖRNSSON, L., KIVAISI, A., RUBINDAMAYUGI, M., MATTIASSON, B. *Effect of particle size on biogas yield from sisal fibre waste*. Renewable Energy 31 (2006) 2385–2392.
- [23] WYMAN, C., DALE, B., ELANDER, R., HOLTZAPPLE, M., LADISCH, M., LEE, Y. *Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies*. Bioresource Technology, 96 (2005) 1959–1966.
- [24] LÓPEZ, M., ESPINOSA, M. *Effect of alkaline pretreatment on anaerobic digestion of solid wastes*. Waste Management ,28 (2008) 2229–2234.
- [25] BAUER, A., BÖSCH, P., FRIEDL, A., AMON, T. *Analysis of methane potentials of steam-exploded wheat straw and estimation of energy yields of combined ethanol and methane production*. Journal of Biotechnology, 142 (2009) 50–55.
- [26] PENAUD, V., DELGENÉS, J., MOLETTA, R., *Thermo-chemical pretreatment of a microbial biomass: influence of sodium hydroxide addition on solubilization and anaerobic biodegradability*. Enzyme and Microbial Technology, 25 (1999) 258–263.
- [27] SUN, Y., CHENG, J. *Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review*. Bioresource Technology, 83 (2002) 1–11.
- [28] HERNÁNDEZ, J.M., SALAS, M.S., VILLA, J.S., VELOZ, K.N., RIVERA, R.A., GONZÁLEZ, M.A., PLASCENCIA, S.R., *Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse*. Bioresource Technology ,100 (2009) 1238–1245.

- [29] MUSSATTO, S.I., FERNANDES, M., MILAGRES, A.M.F., ROBERTO, I.C. *Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain*. *Enzyme and Microbial Technology*, 43 (2008) 124–129.
- [30] NEVES, L., RIBEIRO, R., OLIVEIRA, R., ALVES, M.M. *Enhancement of methane production from barley waste*. *Biomass and Bioenergy*, 30 (2006) 599–603.
- [31] HE, Y., PANG, Y., LI, X., LIU, Y., LI, R., ZHENG, M. *Investigation on the changes of main compositions and extractives of rice straw pretreated with sodium hydroxide for biogas production*. *Energy & Fuels*, 2009, 23, 2220–2224.
- [32] ORTEGA, N., *Phosphorus Precipitation in Anaerobic Digestion Process*. 2002; 11, 12, ISBN: 1-58112-332-9
- [33] KHANAL, S., *Anaerobic Biotechnology for Bioenergy Production. Principles and Applications*. Primera Edición. Blackwell publishing 2008; 27, 47, 52, ISBN: 978-0-813-82346-1

ANEXOS

ANEXO A. Diseño de experimentos

Mediante el diseño factorial en dos niveles uno máximo (1) y uno mínimo (0) fueron determinados los experimentos a realizar.

El número de experimentos es calculado de la expresión:

$$\text{Número de experimentos (n)} = 2^k$$

Donde 2 es el número de niveles y K es el número de variables.

Diseño 1

Variables del Diseño	Niveles	
	0	1
[NaOH] (%p/p)	4	6
Tiempo (horas)	8	24

- Configuración del diseño factorial 2^2

n	Tiempo (horas)	[NaOH] (%p/p)
1	0	0
2	0	1
3	1	0
4	1	1

Diseño 2

Variables del Diseño	Niveles	
	0	1
[NaOH] (%p/p)	0,5	2
Tiempo (horas)	8	24

- Configuración del diseño factorial 2²

n	Tiempo (horas)	[NaOH] (%p/p)
5	0	0
6	0	1
7	1	0
8	1	1

ANEXO B. Protocolo toma de muestra de bagazo

Objetivo: Recoger muestra de bagazo húmedo generado durante el beneficio del fique.

Materiales y Reactivos

- Nevera de icopor
- Hielo
- Alcohol al 70%
- Tiras reactivas de pH
- Guantes de látex
- Bolsa plástica con cierre
- Cinta de enmascarar
- Marcadores permanentes

Procedimiento

1. Escoger hojas de fique en las que no se observen daños ocasionados por alguna clase de microorganismo o éste lacerada.
2. Limpiar la máquina desfibradora de hojas de fique, con alcohol al 70% antes de proceder a tomar la muestra de bagazo.

3. Solicitar al manipulador de la máquina que comience la operación del desfibrado de la hoja de fique. Descartar la primera fracción expulsada del bagazo, tomar la fracción del medio, igualmente descartar la última parte.
4. Llenar la totalidad de las bolsas de la toma de muestra, sin dejar espacios de aire, medir pH y cerrar inmediatamente.
5. Llevar la nevera de icopor con hielo; cerrar y rotular las bolsas con las muestras.
6. Conservar refrigerado hasta su uso.

Nota: Rotular todo el material que contenga todas las muestras con nombre del lugar, día y fecha de la toma de muestra.

ANEXO C. Determinación del contenido de humedad del bagazo de fique

Todas las maderas tienen un contenido de humedad variable que es necesario conocer para referir los resultados de los análisis a peso seco. Se define como peso seco el obtenido al calentar la muestra en una estufa a 105°C hasta peso constante (teóricamente toda el agua ha sido desalojada).

1. PROCEDIMIENTO

De acuerdo con la norma TAPPI T Standard 3 m se procede de la siguiente forma: Pesar una muestra de aproximadamente 2 g. en un recipiente de pesaje tarado preferiblemente del tipo superficial. Secar durante 2 horas en un horno a 105± 3°C, enfriar en un desecador, y pesar. Continuar calentando por períodos sucesivos durante una hora hasta que el peso sea constante. Calcular y registrar el porcentaje humedad.

2. CÁLCULOS

$$\frac{P_2 - P_3}{P_2 - P_1} * 100 = \% \text{ HUMEDAD}$$

Donde:

P_1 = Peso recipiente vacío

P_2 = Peso recipiente + muestra húmeda

P_3 = Peso recipiente + muestra seca

3. RESULTADOS

Expresar los resultados como % de humedad promedio de tres determinaciones con una variación no mayor de 0.1%.

ANEXO D. Determinación de la concentración de azúcares reductores

Objetivo: Determinar la presencia de azúcares reductores producidos por la degradación de la celulosa, durante los procesos de fermentación.

El método DNS o del ácido dinitrosalicílico es un método colorimétrico, desarrollado para la cuantificación de azúcares reductores. Este método es un método rápido y reproducible.

Reactivo DNS

- Mezclar y disolver en 250 mL de agua destilada 8 g de NaOH y 150 g de tartrato sodio potasio.
- Posteriormente agregar 5 g de ácido dinitrosalicílico (marca Merck únicamente)
- Aforar a 500 mL con agua destilada.
- Almacenar a temperatura ambiente y proteger de la luz.

Procedimiento

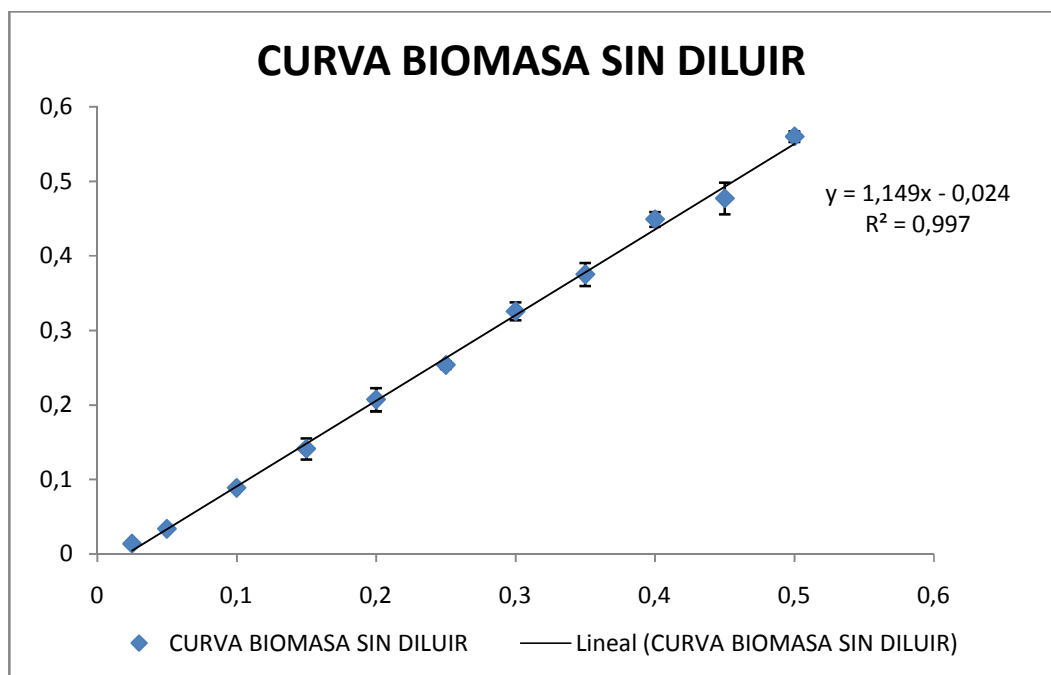
- Agregar 1 mL de reactivo a 1 mL de muestra usando tubos tapa rosca.
- Dejar en baño con agua en ebullición durante 5 minutos.

- Detener la reacción en un baño de hielo.
- Agregar 10 mL de agua destilada, y dejar reposando durante 15 minutos.

Leer densidad óptica a 540 nm contra un blanco obtenido con el procedimiento anterior, pero agregando agua destilada en vez de muestra.

CONSTRUCCIÓN DE LA CURVA ESTÁNDAR DE GLUCOSA

Se preparan las muestras de glucosa con concentraciones conocidas, se aplica el método DNS y se lee su absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm. Con los datos obtenidos, se traza un gráfico lineal de la concentración de glucosa (azúcar reductor) como una función de absorción, y así se determina la ecuación que relaciona las dos cantidades.



ANEXO E. Determinación de ácidos grasos volátiles y alcalinidad en pulpa

La alcalinidad es la capacidad acido-neutralizante de una sustancia química en la solución acuosa. Esta alcalinidad de una sustancia se expresa en equivalentes de base por litro. Esta se puede hallar gracias a diferentes equipos entre los cuales el más importante es el pH-metro.

Materiales:

- Vaso de precipitado de 100mL
- Probeta de 25 mL
- Centrífuga refrigerada
- pH-metro
- Agitador magnético
- 2 Balones esmerilados de fondo redondo o plano
- Condensador
- Plancha de calentamiento
- 2 Buretas
- Soporte de plancha
- Soporte universal
- Pinzas con nuez
- Solución de NaOH al 0,1 N
- Solución de HCl al 0,1 N

Procedimiento:

1. Tomar una muestra aproximadamente de 40 mL diaria o día de por medio durante el proceso de digestión, en tubos falcom de 50 mL.
2. Centrifugar las muestras por 15 minutos a 10000 gravedades.
3. Llevar el sobrenadante a frascos plásticos, medir pH y registrar el valor.
4. Medir 5 mL del sobrenadante y llevarlo a un vaso de precipitado de 100 mL.

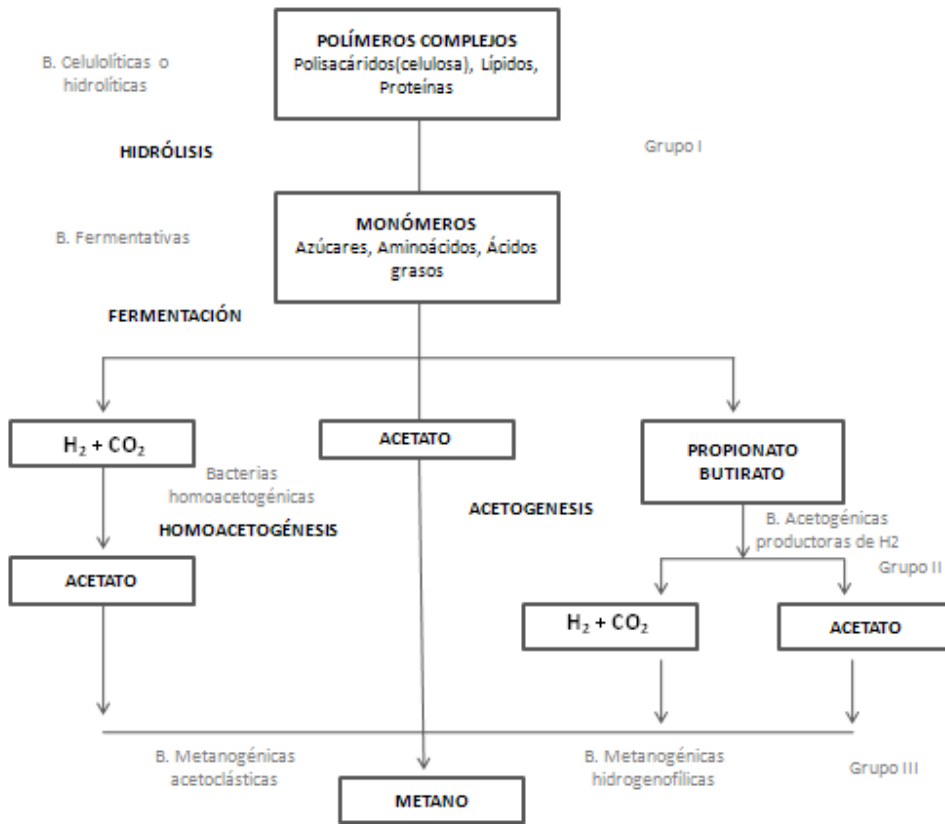
5. Medir en una probeta 25 mL de agua destilada y agregarla a los 5 mL de sobrenadante medido anteriormente.
6. Titular con una solución previamente preparada de HCl 0,1 N hasta alcanzar un pH de 4.5 y registrar volumen (V1), manteniendo agitación continúa.
7. Continuar titulado con la solución de HCl sin dejar de agitar hasta alcanzar un pH de 3, registrar volumen (V2).
8. Llevar la muestra a un balón esmerilado, adaptarlo al condensador.
9. Calentar hasta ebullición y mantener por 2 minutos.
10. Titular con una solución previamente preparada de NaOH 0,1 N hasta alcanzar un pH de 6.5, registrar el volumen (V3).

Cálculos:

$$Alcalinidad = \frac{A1 \ N_{HCl} \ 50000}{50} \left[\frac{mg}{L} \right]$$

$$AGV = \frac{B \ N_{NaOH} \ 60}{50} \left[\frac{g}{L} \right]$$

ANEXO F. Principales etapas de la digestión anaerobia y grupos microbianos involucrados



TIPO DE REACCIÓN	ECUACIÓN
Fermentación de Glucosa a acetato	$\text{Glucosa} + 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + 4\text{H}^+ + 4\text{H}_2$
Fermentación de la glucosa a Butirato	$\text{Glucosa} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{C}_4\text{H}_7\text{O}_2 + 2\text{HCO}_3^- + 3\text{H}^+ + 2\text{H}_2$
Fermentación del Butirato a acetato y H ₂	$\text{Butirato} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + \text{H}_2$

Fermentación del propionato a acetato	$\text{Propionato} + 3\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ + \text{H}_2$
Acetogénesis a partir del H_2 y CO_2	$4\text{H}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + 2\text{H}_2\text{O}$
Metanogénesis a partir del CO_2 y H_2	$4\text{H}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + 3\text{H}_2\text{O}$
Metanogénesis a partir del acetato	$\text{Acetato} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$